



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och
lantbruksvetenskap

Biologisk bekämpning av *Fusarium graminearum*

Biological control of *Fusarium graminearum*

Karolina Jörgensen

Biologisk bekämpning av *Fusarium graminearum*

Biological control of *Fusarium graminearum*

Karolina Jörgensen

Handledare: Hanna Friberg, Sveriges Lantbruksuniversitet,
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Examinator: Dan Funck Jensen, Sveriges Lantbruksuniversitet,
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i biologi - kandidatarbete

Kurskod: EX0689

Program/utbildning: Mark-/växtagronom

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2014

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Biologisk bekämpning, *Fusarium graminearum*, *Clonostachys rosea*,
Pseudomonas chlororaphis

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och lantbruksvetenskap
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

1 Abstract

Fusarium graminearum causes reduction in both yield and quality in cereal grain worldwide. One of the diseases it can cause is Fusarium Head Blight (FHB). Both sexually and asexually produced spores can infect living plants. Asexual conidia are produced in the mycelium while sexual ascospores form in asci in perithecia on debris. In biological control, living organisms are used to control pests and diseases. In this study, the effect of two biological control organisms, *Clonostachys rosea* and *Pseudomonas chlororaphis* was examined to see if they could reduce production of perithecia as well as sexual and asexual spores on winter wheat. Two trials were made with some minor alterations. When treated with *C. rosea*, the number of perithecia on wheat straws decreased in the second trial but had no effect in the first. *P. chlororaphis* had no effect in either of the trials, neither did a combination of the organisms.

2 Sammanfattning

Fusarium graminearum orsakar både skörde- och kvalitetsförluster i stråsäd världen över. En av de sjukdomar den orsakar är axfusarios. Både sexuellt och asexuellt producerade sporer av *F. graminearum* kan smitta plantor. De asexuella konidierna bildas i mycelet medan sexuella ascosporer bildas i asci i perithecier på halmrester. I biologisk bekämpning används levande organismer för att kontrollera skadegörare och sjukdomar. I denna studie undersöktes effekten av två biologiska bekämpningsorganismer, *Clonostachys rosea* och *Pseudomonas chlororaphis* för att se om de kan reducera produktionen av perithecier samt sexuella och asexuella sporer på halm av höstvet i två försök. *C. rosea* reducerade perithecieantalet i det andra försöket men inte i det första. Behandling med *P. chlororaphis* gav ingen effekt. Perithecieantalet minskade inte heller när en kombination av de båda organismerna tillfördes.

1	Abstract	1
2	Sammanfattning	2
3	Introduktion	5
3.1	Bakgrund	6
3.1.1	Patogenen <i>Fusarium graminearum</i>	6
3.1.2	Svampen <i>Clonostachys rosea</i>	7
3.1.3	Bakterien <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	8
3.1.4	Biologisk bekämpning av <i>F. graminearum</i>	8
3.2	Syfte	9
4	Material och metod	10
4.1	Uppförförökning av <i>F. graminearum</i> och <i>C. rosea</i>	10
4.2	Försök 1 – biokontrolleffekt vid olika halmbehandlingar	10
4.3	Försök 2 – biokontrolleffekt vid olika doser	12
4.4	Inkuberingsförhållanden	12
4.5	Avläsning	13
4.5.1	Försök 1 – biokontrolleffekt vid olika halmbehandlingar	13
4.5.2	Försök 2 – biokontrolleffekt vid olika doser	14
4.6	Statistisk analys	14
5	Resultat	15
5.1	Försök 1 – Biokontrolleffekt vid olika halmbehandlingar	15
5.1.1	Effekter på perithecier och ascosporer	15
5.1.2	Effekten på konidier	18
5.2	Försök 2 – Biokontrolleffekt vid olika doser	19
5.2.1	Effekter på perithecier och ascosporer	19

5.2.2	Effekten på konidier	21
6	Diskussion	23
7	Litteraturlista	27
8	Bilagor	29
8.1	Bilaga 1 – recept SNA	29

3 Introduktion

”Jag önskar att allt kunde vara ekologiskt! Så blir det nog i framtiden.”, hörde jag en butiksanställd säga till en kund härom veckan. Uttalandet är representativt för den debatt kring livsmedel som pågår i Sverige idag. Många efterfrågar mat som producerats utan användning av kemiska bekämpnings- och gödselmedel. Som ett exempel kan man titta på värdet på livsmedel gjort av ekologiskt producerat spannmål som mellan år 2004 och 2012 ökat från 395 till 711 miljoner kronor (SCB, 2014). Jordbruksnäringen måste kunna svara på en ökad efterfrågan på denna typ av livsmedel.

En minskad kemikalieanvändning har fler värden än att leva upp till konsumenters önskemål om ”giftfri produktion”. Resistensutveckling hos patogener är ett utbrett problem som troligen kommer att öka om man inte börjar använda sig av alternativa bekämpningsmetoder. EU:s nya IPM-direktiv som trädde i kraft 1 januari 2014 eftersträvar ett fortsatt högproduktivt jordbruk med minskad kemikalieanvändning. För att detta ska fungera måste man behovsanpassa bekämpning av skadegörare, tex genom att se över växtföljder och utforma bekämpningströsklar. Ett komplement eller ersättning till en kemisk behandling är biologisk bekämpning. I biologisk bekämpning används levande organismer för att kontrollera skadegörare och sjukdomar. Då utnyttjas naturliga processer som interspecifik konkurrens och predation men även induktion av växters naturliga försvarssystem samt produktion av hämmande substanser och kan därmed minska sjukdoms- och skadegörarproblem. I detta arbete undersöks effekten av två biologiska bekämpningsorganismer på den växtpatogena svampen *Fusarium graminearum*.

3.1 Bakgrund

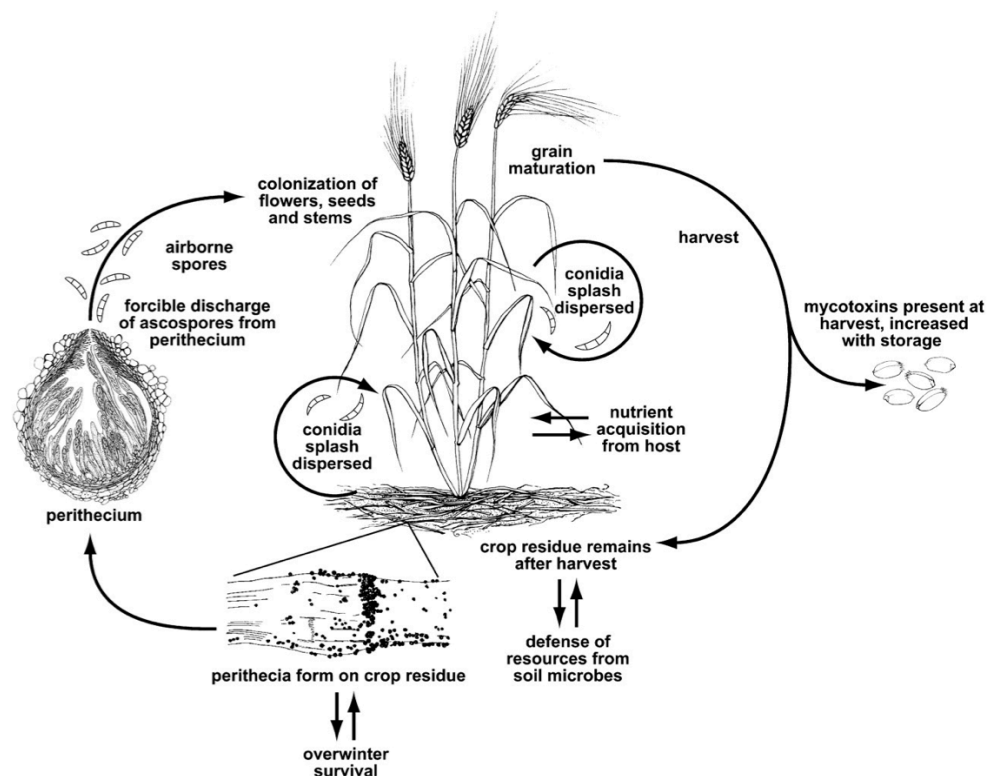
Fusarium spp. orsakar ett flertal olika sjukdomar i jordbruksgrödor världen över. Förutom att verka direkt skördesänkande kan vissa arter av svampen även bilda mykotoxiner som är skadliga för människor och djur om angripna plantor används till livsmedelsproduktion (SJV, 2013). *Fusarium* spp. är jordburna patogener som överlever på dött växtmaterial (Burgess, 1981 i Steinkellner och Langer, 2004). *F. graminearum* (teleomorf *Giberella zeae*) är en av de fusariumsvampar som orsakar axfusarios i spannmål (eng. Fusarium Head Blight, FHB) i Sverige och i andra länder med tempererat klimat. Globalt har man sett en ökning av axfusarios men orsaken till detta är inte helt fastställt. En anledning kan vara övergången till ett mer reducerat jordbearbetningssystem (Dill-Macky, 2008). Ett beprövat sätt att motverka axfusarios är att göra en jordbearbetning där halmen, tillika inokulumkällan vänds ned i jorden. Spridningen upp i grödan försvåras då (Dill-Macky och Jones, 2000). Förutom jordbearbetning påtalas också en varierad växtföljd som ett viktigt verktyg för att minska axfusariossmitta (Gilbert och Fernando, 2004). Det finns i Sverige inget kemiskt preparat för bekämpning av axfusarios i växande gröda (SJV, 2013). Däremot betas en stor del av utsädet eftersom smittan kan vara utsädesburen.

Toxin-halterna i ekologiskt producerat spannmål är i vissa fall lägre än i konventionellt odlat. Berhnhof m fl. (2010) såg i en norsk studie att halterna toxiner bildade av *F. graminearum* var signifikant lägre i ekologiskt odlad havre och korn. Detta kan bero på att konkurrensen från andra organismer är högre där ingen kemisk bekämpning använts (Dik, 1992 i Henriksen och Elen, 2005). Detta faktum blir intressant när man börjar se över möjligheten till biologisk bekämpning. Försök har gjorts, bland annat med svampen *Trichoderma harzianum* (Inch och Gilbert, 2007), för att undersöka huruvida det går att begränsa utvecklingen hos *F. graminearum*.

3.1.1 Patogenen *Fusarium graminearum*

F. graminearum har både sexuella och asexuella faser i sin livscykel (fig 1). I det sexuella stadiet kallas den för *Gibberella zeae*. I det asexuella stadiet produceras konidier (makrokonidier) som i de flesta fall sprids med regnstänk i beståndet, viss spridning kan även ske med insekter som vektor. I den sexuella delen av livscykeln produceras ascosporer som kan spridas med vinden. Både konidier och ascosporer kan under blomningsperioden infektera och orsaka axfusarios (Gilbert och Fernando, 2004). Än är det inte helt fastställt vilket som är den viktigaste formen av inokulum.

Ascosporerna bildas i asci i perithecier på halmytan (Trail och Common, 2000). Förstadier till perithecierna bildas ofta på hösten medan mognad sker på våren. *F. graminearum* kan även övervintra som mycel eller konidier på halmrester i marken. I ett laboratorieförsök visade det sig att störst antal ascosporer skjuts ut 6 till 9 dagar efter att perithecierna mognat (Trail m fl., 2002). I samma försök såg man även att peritheciernas aktivitet ökade vid ökad luftfuktighet. Dock har tidigare försök visat att ökad luftfuktighet inte hade någon positiv effekt utskjutandet av ascosporer samt att en relativ luftfuktighet på över 80 % verkar hämmande (Paulitz, 1996). Paulitz såg däremot en regelbundenhet i aktiviteten hos perithecierna, störst mängd ascosporer sköts ut under natten medan aktiviteten gick ned under dagen. Temperaturen spelar också en roll i hur storm mängd ascosporer som frigörs. Utskjutande sker i temperaturintervallet 11-23 °C med ett optimum på 16,6 °C (Tschanz m fl., 1976).



Figur 1. Livscykel för *F. graminearum* (sexuell fas *Gibberella zeae*) efter Trail (2009).

3.1.2 Svampen *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea (tidigare kallad *Gliocladium roseum*) är en naturligt förekommande saprofytt i marken. Den har visat sig vara en effektiv antagonist mot flera växtpatogener, bland annat *Fusarium culmorum*. I ett försök där

kornkärnor doppades i en lösning med sporer från *C. rosea* och sedan inokulerades med *F. culmorum* minskade angreppen med över 80 % jämfört med kontrollen (Jensen m fl. 2000). Man har även visat att myceltillväxten kan reduceras när konidier tillförts *F. culmorum*-inokulerad halm (Hue m fl., 2009). Anledningen till dess lämplighet som kontrollorganism beror på att den har en bred ekologisk nisch. Den kan dessutom verka hämmande för andra svampar på olika sätt, bland annat genom att bilda hyfnedbrytande enzymer (Pachenari och Dix, 1980). Den kan även förhindra spridning och tillväxt genom att penetrera andra arters hyfer, konidier och konidioforer (Vakili, 1985).

3.1.3 Bakterien *Pseudomonas chlororaphis*

Pseudomonas spp. finns naturligt i jorden och i rotzonen hos växter. Flera arter används redan idag eller har potential att användas som biokontrollorganismer. Biokontrollpreparatet Cedomon som baseras på *P. chlororaphis* (MA342) lanserades 1997 av Lantmännen BioAgri och har sedan dess använts som betningsmedel i havre och korn. 2006 godkändes Cerall baserat på samma bakterie för betning av vete (KemI). *P. chlororaphis* har i dessa preparat haft stor effekt på många utsädesburna sjukdomar, tex kornets bladfläcksjuka och groddbränna. Vid betning med *P. chlororaphis* koloniserar bakterien växtens rhizosfär och skyddar därmed även mot jordburna svampsjukdomar genom att producera olika svamphämmande substanser (Park m fl., 2011). Andra vanliga verkningsmekanismer hos *Pseudomonas* spp. är inducerad resistens, produktion av lytiska enzymer och av starkt järnbindande ämnen, sideroforer (Bakker m fl., 2007).

3.1.4 Biologisk bekämpning av *F. graminearum*

Biologisk bekämpning av *F. graminearum* kan göras i olika skeden av dess livscykel. Idag sker den största bekämpningen i form av utsädesbetning. Det är främst utsädesburen smitta som groddbränna som kan kontrolleras på det sättet. Det har dock gjorts många försök på bekämpning i andra stadier, bland annat har man visat att perithecie- och konidieproduktionen kan minskas.

I försök där olika isolat av *Trichoderma harzianum* använts som antagonist producerades upp till 99 % färre perithecier än hos obehandlade led. Många av de testade isolaten nådde dock inte denna höga grad av reduktion utan de varierade mellan 16-87 % (Inch och Gilbert, 2007).

Försök har även gjorts där *C. rosea* använts som kontrollorganism. Man visade att myceltillväxten minskade med 56 % samtidigt som groningen av sporer helt uteblev (Hue m fl., 2009). I det försöket sprayades en konidiesuspension av *C. rosea* på veteax två dagar innan *F. graminearum*. Resultatet kan därför vara svårt

att översätta till fältförhållanden då det är svårt att kontrollera när inokulum når växten. I ett annat försök användes *C. rosea* för att undersöka hur konidieproduktionen på vetehalm påverkades. Halmen strålades med gammastrålning och sporsuspensioner av *F. graminearum* och *C. rosea* sprayades på dem, därefter lades halmen på fuktat filterpapper i petriskålar. I försöket minskade produktionen med över 90 % (Luongo m fl., 2005).

I fältförhållanden har *F. graminearum* bekämpats med *C. rosea* med lyckat resultat i ett försök i Argentina (Palazzini m fl., 2013). Halm lämnades kvar i fält där *F. graminearum* förekommit. Man tillförde sedan en konidiesuspension av *C. rosea* och följde utvecklingen under växtsäsongen genom att mäta mängden DNA från de aktuella organismerna. Efter 90 dagar hade DNA-mängden från *F. graminearum* minskat med 73 % och efter 180 dagar fanns inga detekterbara mängder.

3.2 Syfte

Hypoteserna som testades i försök 1 var att inokulering med någon av de biologiska bekämpningsorganismerna hämmar utveckling av perithecier, produktion av ascosporer samt konidieproduktionen, och att såväl produktionen av de olika sportyperna som effekten av bekämpningsorganismerna påverkas av om halmmaterialet autoklaverats eller ytsteriliserats. I försök 2 testades åter hypotesen om effekten av bekämpningsorganismerna. Dessutom testades hypoteserna att en kombinationsbehandling med båda organismerna tillsammans ger en bättre effekt än varje organism för sig samt att bekämpningsorganismernas effektivitet minskar med halverad dos.

4 Material och metod

Som utgångspunkt för försöksupplägget har samma metod som i försöket med *T. harizanum* använts (Inch och Gilbert, 2007). Icke fungicidbehandlad halm av höstvetesorten Olivin användes. Halmen klipptes i 3 cm långa bitar med en nod i mitten.

4.1 Uppförrökning av *F. graminearum* och *C. rosea*

F. graminearum (isolat VPE 104) ympades in på SNA. Därefter inkuberades svampen i 14 dagar i klimatkammare med temperaturen 20 °C samt NUV- och vitt ljus 20 h/dygn. *C. rosea* (IK726) ympades på liknande sätt på PDA (Potatoe Dextrose Agar, Sigma-Aldrich, Spanien). Receptet för SNA redovisas i bilaga 1. Efter inkubationen räknades konidiekoncentrationen för respektive svamp ut i Bürkerkammare. Detta gjordes genom att till petriskålarna med de uppodlade svamparna tillföra 3 ml sterilt vatten till *F. graminearum* och 4 ml till *C. rosea*. Hela agarytan sköljdes av för att samla upp alla sporer.

Fermentat av *P. chlororaphis* (MA342) erhöles från Lantmännen BioAgri och späddes till $1 \cdot 10^{10}$ cfu/ml innan försökets början. Lösningen förvarades sedan i 4 °C.

4.2 Försök 1 – biokontrolleffekt vid olika halmbehandlingsar

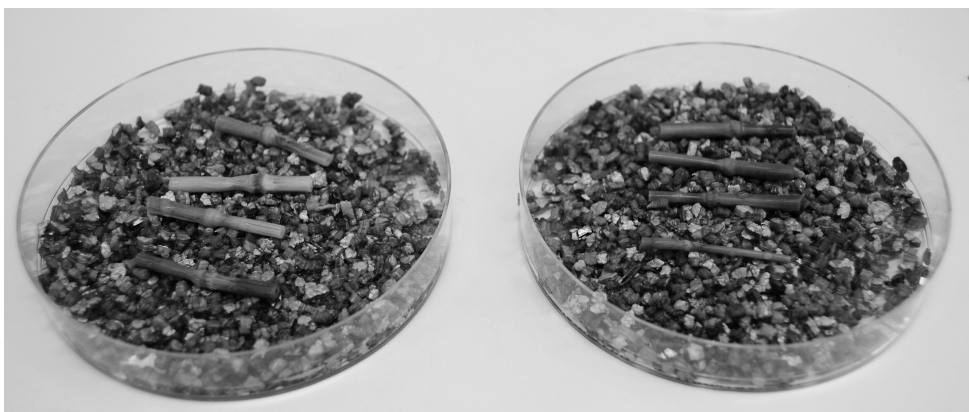
I försök ett var syftet att jämföra perithecie- och sporproduktionen i *fusarium*-inokulerad halm behandlad med *C. rosea* och *P. chlororaphis*. Dessa behandlingsar gjordes dels i autoklaverat växtmaterial men även i ytsteriliserat material för att även undersöka om halmens förbehandling gjorde skillnad för försökets utfall.

Totalt utfördes sex olika behandlingsar, dessa var:

- Kontroll autoklaverad
- Kontroll ytsteriliserad
- *C. rosea* autoklaverad
- *C. rosea* ytsteriliserad
- *P. chlororaphis* autoklaverad
- *P. chlororaphis* ytsteriliserad

Varje behandling upprepades tre gånger (A-, B-, och C-led) med fyra halmbitar per behandling (fig. 2). Totalt användes således $6 \times 3 \times 4 = 72$ halmbitar i försöket. 20 ml autoklaverad vermikulit, som siktats till 2 mm eller mindre stora bitar, mättes upp i petriskålar (9 cm i diameter) och tillfördes 12,5 ml sterilt vatten. Halm som autoklaverats två gånger med 24 h mellan autoklavingarna lades i en petriskål och 7,5 ml *F. graminearum*-sporlösning med koncentrationen $6,7 \times 10^4$ makrokonidier/ml tillfördes (ca 200 µl/halmbit). Halmbitarna fick ligga i lösningen i två minuter innan de fördelades på vermikuliten. För att undvika frågetecken kring betydelsen av den exakta tiden i sporlösningen fördelades först en halmbit i varje petriskål i upprepning A följt av B och C. Därefter fördelades de följande bitarna på samma sätt.

Efter 15 minuter tillfördes 200 µl sporlösning från *C. rosea* ($1,6 \times 10^7$ sporer/ml) och *P. chlororaphis* (1×10^{10} cfu/ml), först i upprepning A följt av B och C. Kontrollerna tillfördes 200 µl vatten. Samma förfarande användes för den ytsteriliserade halmen med undantag för autoklavingen, istället steriliserades den i 80 % etanol i 2 minuter och den sköljdes sedan av i 2 vattenbad med sterilt vatten.



Figur 2. Varje behandling upprepades tre gånger med fyra halmbitar i varje petriskål. Halmbitarna var tre cm långa och hade en nod.

4.3 Försök 2 – biokontrolleffekt vid olika doser

I försök två studeras effekten av biokontrollorganismerna dels för sig men också när de kombineras med varandra, dessutom användes två olika koncentrationer. Fulldosen (100 %) motsvarade samma dosnivå som i försök 1 och den halverade dosen (50 %) var hälften av det. Detta försök utförs till skillnad från försök ett endast på autoklaverat material.

- Kontroll (K)
- *C. rosea* 100 % (Cr100)
- *C. rosea* 50 % (Cr50)
- *P. chlororaphis* 100 % (Pc100)
- *P. chlororaphis* 50 % (Pc50)
- *C. rosea* + *P. chlororaphis* 100/100 (Mix100)
- *C. rosea* + *P. chlororaphis* 50/50 (Mix50)

Även i detta försök upprepades varje behandling tre gånger med fyra halmbitar i varje. Totalt $3 \times 7 \times 4 = 84$ halmbitar.

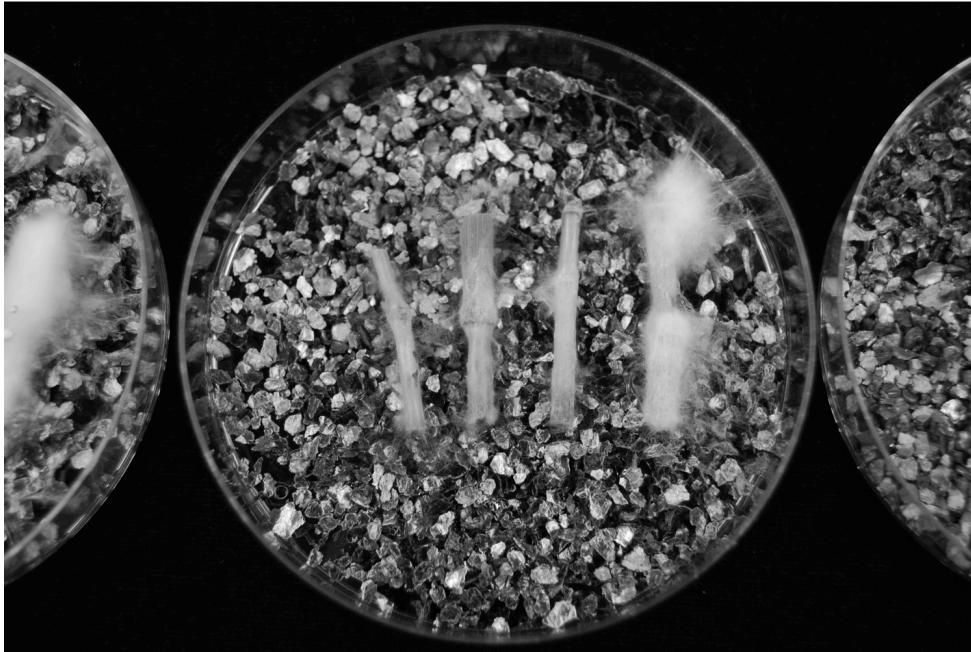
Metoden för applicering var samma som i försök ett med små förändringar gällande koncentrationer. Koncentrationen för *F. graminearum* var $7,1 \times 10^4$ konider/ml och för *C. rosea* $3,2 \times 10^7$ konider/ml i behandlingarna med 100 % av dosen. I den kombinerade behandlingen (Mix100) tillsattes 200 µl av vardera organism. I de led där endast 50 % av dosen gavs späddes konidiesuspensionerna till halva koncentrationen och applicerades sedan med samma volym som fulldosen.

4.4 Inkuberingsförhållanden

Halmen inkuberades i båda försöken i klimatkammare med 20 timmars NUV + vitt ljus och en temperatur på 20 °C under sex veckor. Vermikuliten hölls under denna tid fuktig genom att regelbundet tillföra steriliserat vatten så att det hela tiden var kondens på petriskålarnas lock. Under de sista veckorna på försök två sänktes temperaturen under de mörka timmarna till 15 °C medan det fortsatt var 20 °C under de ljusa timmarna.

4.5 Avläsning

Efter fyra veckor rensades halmbitarna med pincett från mycel och vermikulit och antalet perithecier räknades med hjälp av stereolupp. Uppskattningar av antalet behövdes i vissa fall göras då perithecierna tenderar att växa i täta klungor.



Figur 3. Halmstrån innan mycelet rensades bort för räkning av perithecier.

Locken på petriskålarna sköljdes ur med 2 ml vatten för att kunna undersöka om några ascosporer skjutits ur. Sporlösningen samlades upp i Eppendorfrör och sporererna räknades i Bürkerkammare.

Vid försökets slut lades de fyra halmstråna från respektive petriskål i ett falconrör (15 ml) med 5 ml vatten. De fick vila i vattnet ca två minuter för att sedan vortexas i 30 sekunder. Därefter plockades halmen ur röret och konidiekoncentrationen i vattenlösningen avlästes i Bürkerkammare. Mängden konidier delades sedan med antalet halmstrån per petriskål för att få ett genomsnittligt värde för produktionen per strå.

4.5.1 Försök 1 – biokontrolleffekt vid olika halmbehandlingar

Antalet perithecier räknades under stereolupp tre gånger: fyra, fem och sex veckor efter försökets början. Försöket avslutades sju veckor efter start. Då tvättades konidier av stråna enligt beskrivningen under punkt 4.5.

4.5.2 Försök 2 – biokontrolleffekt vid olika doser

Perithecierna räknades vecka fyra och sex från försökets början. Ascosporeerna fångades efter vecka fem på objektglas med dubbelhäftande tejp fästade i petriskålens lock. Samtidigt sänktes temperaturen i klimatskåpet under de mörka timmarna till 15 °C, detta för att stimulera frigörandet av ascosporer. Försöksavslut skedde sju veckor efter start.

4.6 Statistisk analys

Perithecieantalet (genomsnittet för de fyra halmbitarna i samma petriskål) \log_{10} -transformerades för att resultatet skulle bli normalfördelat (Shapiro-Wilk normality test) och analyserades genom variabelanalys (ANOVA), med biologisk kontrollbehandling (ingen, Cr, Pc) och halmbehandling (autoklaverad, ytsteriliserad) som faktorer samt interaktionen mellan dessa två behandlingstyper i försök 1 och biologisk bekämpningsbehandling (ingen, Cr100, Cr50, Ps100, Ps50, Mix100, Mix50) i försök två. Varje avläsningstillfälle behandlades i separata analyser. Parvisa jämförelser gjordes med hjälp av Tukey's test ($P < 0,05$). Samtliga statistiska analyser gjordes i R (R Development Core Team, 2012).

5 Resultat

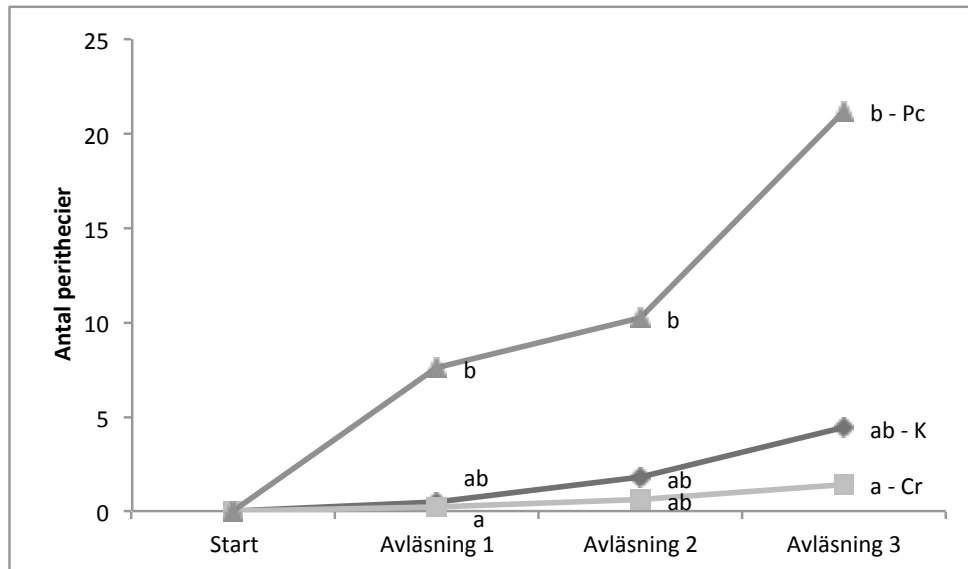
5.1 Försök 1 – Biokontrolleffekt vid olika halmbehandlingar

5.1.1 Effekter på perithecier och ascosporer

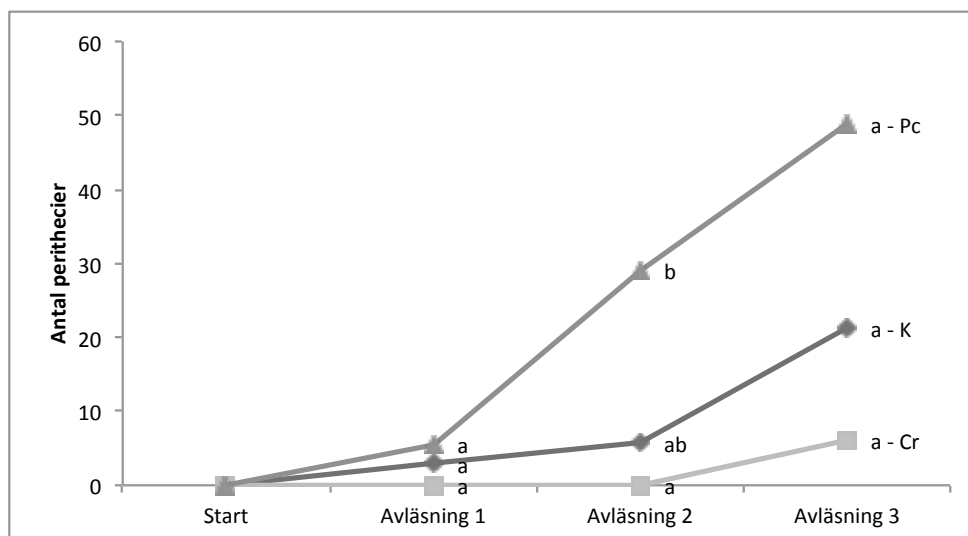
Under försökets första veckor bildades mycket mycel. När mycelet vid första avläsningen plockades bort med pincett fanns ett litet antal perithecier under. Vid den andra avläsningen hade produktionen kommit igång mer och det hade i de led som behandlats med *P. chlororaphis* bildats runt 10 perithecier per halmstrå på den autoklaverade halmen (fig. 4 och 6) och runt 20 stycken på den ytsteriliserade (fig. 5 och 7). Vid den sista avläsningen hade antalet ökat ytterligare i samtliga behandlingar. Minst antal perithecier bildades när halmen behandlats med *C. rosea*. Detta gäller för båda halmbehandlingarna. Produktionen i leden med *C. rosea* var signifikant skilda från de med *P. chlororaphis* i alla avläsningar med undantag för avläsning 3 i den ytsteriliserade halmen. Det fanns ingen signifikans när de båda behandlingarna jämfördes med kontrollen (fig. 4-7).

I jämförelsen mellan de olika halmbehandlingarna, autoklaverat/ytsteriliserat fanns inte någon signifikans. Vid försöksavslut visade det sig att det i samtliga autoklaverade led fanns en kontamination med *C. rosea*. Därför har försöksresultaten bearbetats var för sig.

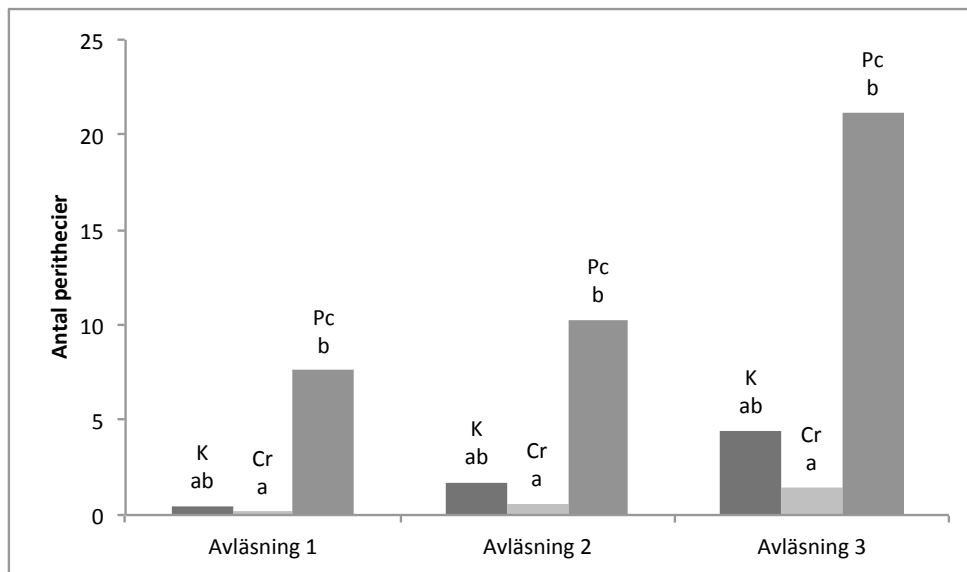
Inga ascosporer fångades upp i locken på petriskålarna vilket innebär att inga data gällande det kunde behandlas i detta försök.



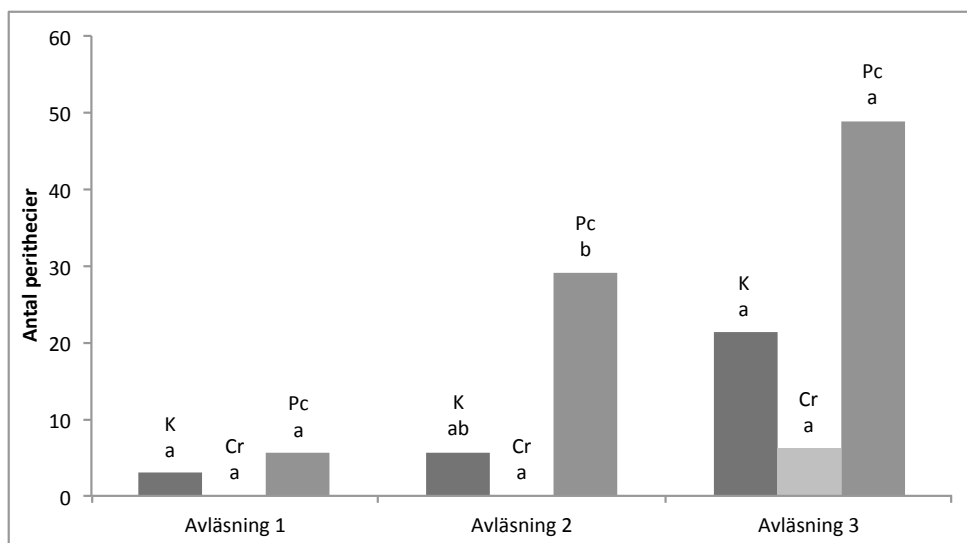
Figur 4. Perithecieproduktion över tid i försök 1 på autoklaverad halm, efter behandling med *P. chlororaphis*, *C. rosea* och i vattenbehandlad kontroll (medelvärden för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver vid markörerna anger statistiskt signifikanta skillnader mellan behandlingar inom respektive avläsningstillfälle (Tukeys test $P<0,05$). Markörer med samma bokstäver är inte statistiskt signifikant skilda från varandra. Tiden mellan start och avläsning 1 var fyra veckor, därefter skedde avläsningarna med en veckas mellanrum.



Figur 5. Perithecieproduktion över tid i försök 1 på ytsteriliserad halm, efter behandling med *P. chlororaphis*, *C. rosea* och i vattenbehandlad kontroll (medelvärden för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver vid markörerna anger statistiskt signifikanta skillnader mellan behandlingar inom respektive avläsningstillfälle (Tukeys test $P<0,05$). Markörer med samma bokstäver är inte statistiskt signifikant skilda från varandra. Tiden mellan start och avläsning 1 var fyra veckor, därefter skedde avläsningarna med en veckas mellanrum.



Figur 6. Perithecieproduktion över tid i försök 1 på autoklaverad halm, efter behandling med *C. rosea*, *P. chlororaphis* samt en vattenbehandlad kontroll (medelvärden för respektive behandling, $n=3$). Avläsning 1 skedde fyra veckor efter försöksstart, därefter skedde avläsningarna med en veckas mellanrum.



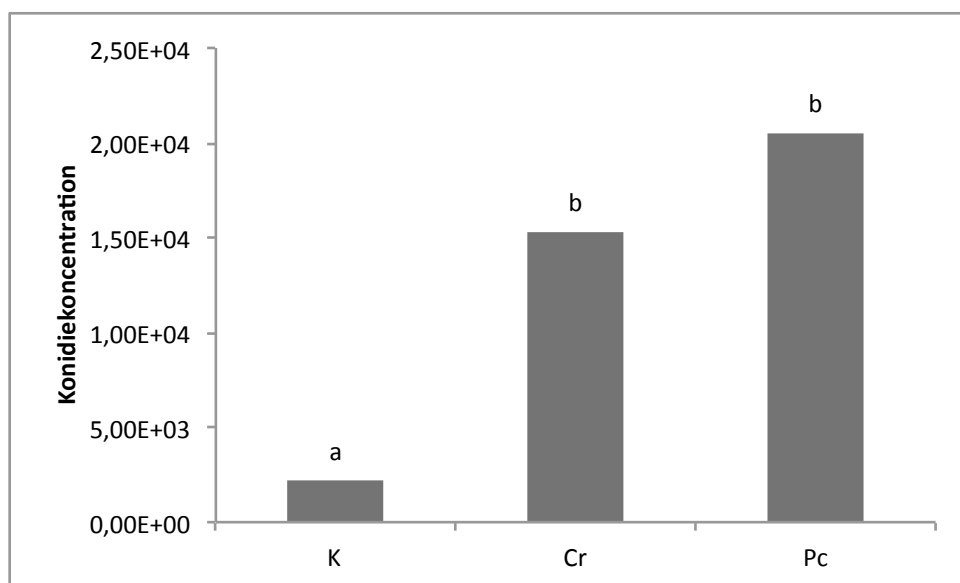
Figur 7. Perithecieproduktion över tid i försök 1 på ytsteriliserad halm, efter behandling med *C. rosea*, *P. chlororaphis* samt en vattenbehandlad kontroll (medelvärden för respektive behandling, $n=3$). Avläsning 1 skedde fyra veckor efter försöksstart, därefter skedde avläsningarna med en veckas mellanrum.

5.1.2 Effekten på konidier

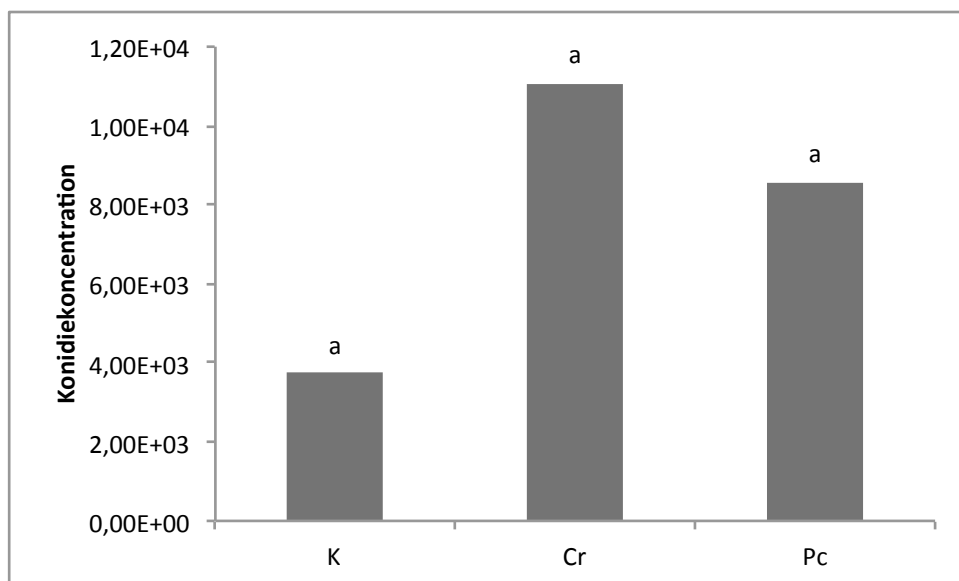
Vid försökets slut fanns en signifikant skillnad i antalet konidier mellan kontrollen och behandlingarna med respektive kontrollorganism i den autoklaverade halmen. Det fanns betydligt färre konidier i kontrollen. Däremot fanns ingen skillnad mellan *C. rosea* och *P. chlororaphis*. En samspelseffekt fanns mellan halmbehandling och konidiekoncentrationen – mer konidier bildades på den autoklaverade halmen än i den ytsteriliserade (fig. 8).

I den ytsteriliserade halmen fanns ingen signifikans mellan de olika behandlingarna (fig. 9).

Vid räkningen i Bürkerkammare visade det sig finnas konidier från *C. rosea* i alla prover i de autoklaverade leden. Koncentrationen var runt $1,1 \cdot 10^7$ konidier/ml, vilket var lägre än i de upprepningar som behandlats med *C. rosea*.



Figur 8. Konidiekoncentration (konidier/ml) i den autoklaverade halmen efter behandling med *P. chlororaphis*, *C. rosea* samt i vattenbehandlad kontroll i försök 1. (Medelvärden för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver ovanför staplarna anger statistiskt signifikanta skillnader mellan behandlingar (Tukeys test $P<0,05$). Staplar med samma bokstäver är inte statistiskt signifikant skilda från varandra. Konidierna tvättades av halmen vid försökets avslut, sju veckor efter start.



Figur 9. Konidiekoncentration (konidier/ml) i den ytsteriliserade halmen efter behandling med *P. chlororaphis*, *C. rosea* samt i vattenbehandlad kontroll i försök 1. (Medelvärden för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver ovanför staplarna anger statistiskt signifikanta skillnader mellan behandlingar (Tukeys test $P<0,05$). Staplar med samma bokstäver är inte statistiskt signifikant skilda från varandra. Konidierna tvättades av halmen vid försökets avslut, sju veckor efter start.

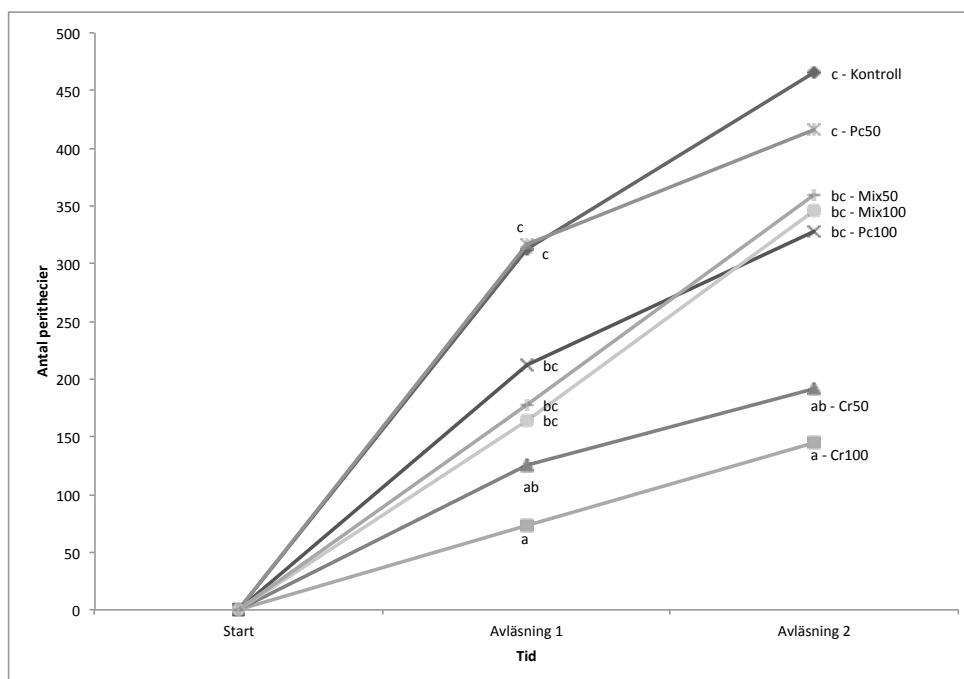
5.2 Försök 2 – Biokontrolleffekt vid olika doser

5.2.1 Effekter på perithecier och ascosporer

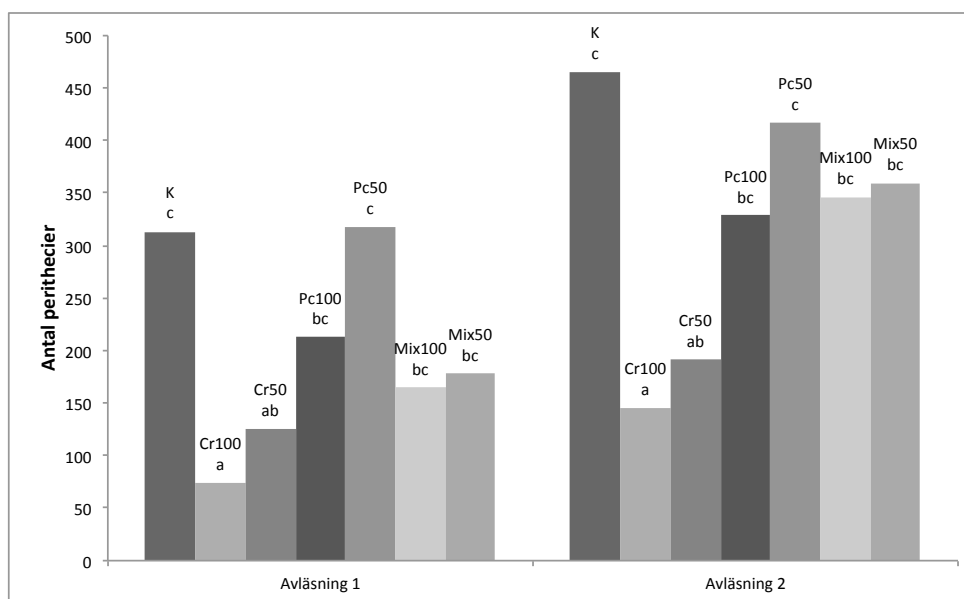
Jämfört med försök 1 var perithecieproduktionen i försök 2 mycket större, den kom även igång tidigare. I försök 2 var det genomsnittliga antalet perithecier vid den sista avläsningen i det led som behandlats med fulldos *P. chlororaphis* runt 340 st medan det i försök 1 var runt 35.

De två avläsningar som gjordes visade samma resultat gällande signifikans i perithecierreducerande verkan. Behandlingen med full dos av *C. rosea* (Cr100) var vid båda avläsningstillfällena signifikant skild från alla övriga behandlingar, med undantag för den halverade dosen (Cr50). Cr50 var skild från kontrollen (K) och den halverade dosen *P. chlororaphis* (Ps50). Varken behandling med *P. chlororaphis* eller en blandning av organismerna hade någon statistiskt signifikant effekt (fig. 10 och 11).

Inte heller i detta försök skedde någon lyckad insamling av ascosporer.



Figur 10. Perithecieproduktion över tid i försök 2 efter behandling med full dos av *C. rosea* (Cr100) och *P. chlororaphis* (Pc100), halverade doser av *C. rosea* (Cr50) och *P. chlororaphis* (Pc50), full dos av en blandning av organismerna (Mix100), halverad dos av blandningen (Mix50) samt en vattenbehandlad kontroll (K; medelvärde för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver vid markörerna anger statistiskt signifikanta skillnader (Tukeys test, $P<0,05$).

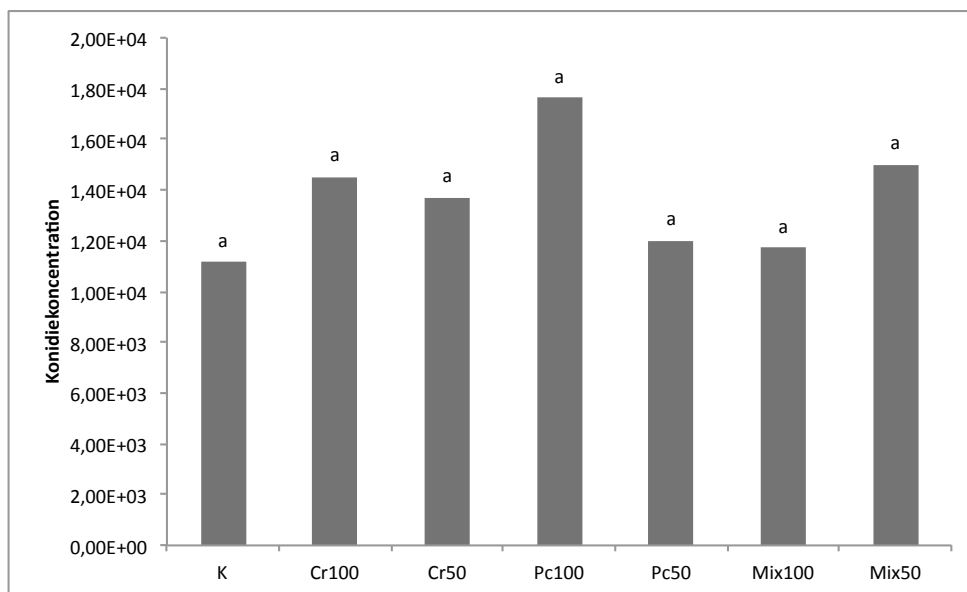


Figur 11. Perithecieproduktion över tid i försök 2, efter behandling med full dos av *C. rosea* (Cr100) och *P. chlororaphis* (Pc100), halverade doser av *C. rosea* (Cr50) och *P. chlororaphis* (Pc50), full dos av en blandning av organismerna (Mix100), halverad dos av blandningen (Mix50) samt en vattenbehandlad kontroll (K; medelvärde för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver ovanför

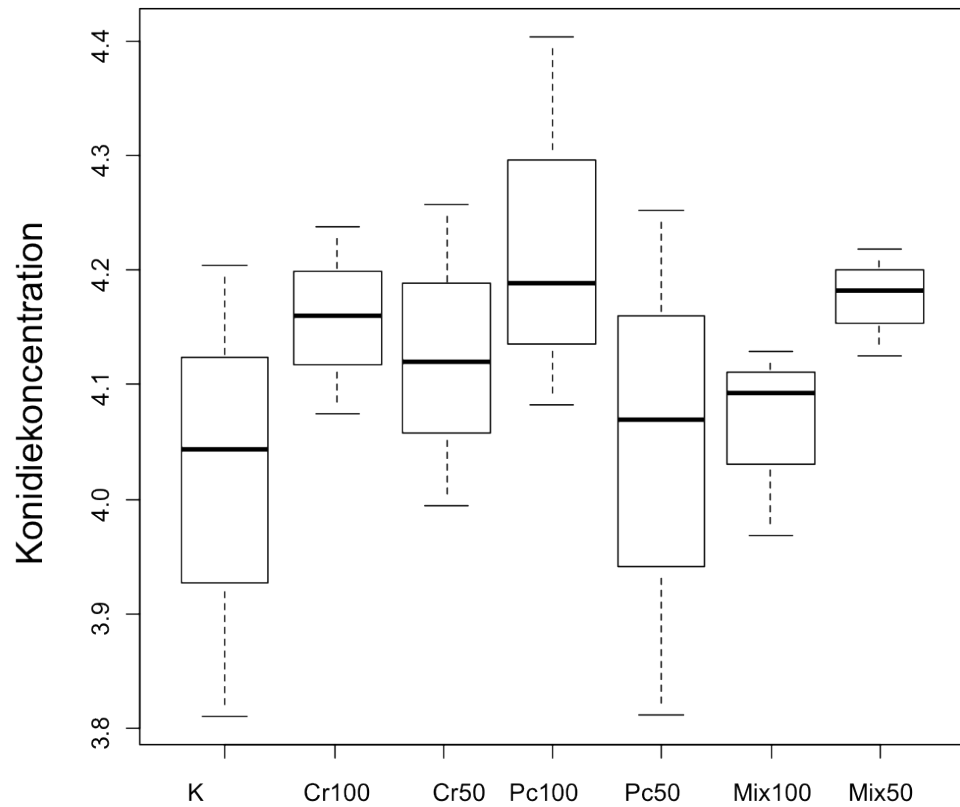
staplarna anger statistiskt signifikanta skillnader mellan behandlingar inom respektive avläsningstillfälle (Tukeys test $P < 0,05$). Markörer med samma bokstäver är inte statistiskt signifikant skilda från varandra. Tiden mellan start och avläsning 1 var fyra veckor, därefter dröjde det två veckor till avläsning 2.

5.2.2 Effekten på konidier

Vid försökets avslut sju veckor efter start fanns ingen signifikans mellan mängder konidier för de olika behandlingarna. \log_{10} -värdet för kontrollen låg mellan 3,8 och 4,2 medan medianen för alla behandlingar låg mellan 4,05 och 4,2 (fig 12 och 13).



Figur 12. Konidiekoncentration (konidier/ml) i försök 2 efter behandling med full dos av *C. rosea* (Cr100) och *P. chlororaphis* (Pc100), halverade doser av *C. rosea* (Cr50) och *P. chlororaphis* (Pc50), full dos av en blandning av organismerna (Mix100), halverad dos av blandningen (Mix50) samt en vattenbehandlad kontroll (K; medelvärde för respektive behandling, $n=3$). Olika bokstäver ovanför staplarna anger statistiskt signifikanta skillnader (Tukeys test, $P < 0,05$). Konidierna tvättades av halmen vid försökets avslut, sju veckor efter start.



Figur 13. Log₁₀-transformerad konidiekoncentration efter behandling med full dos av *C. rosea* (Cr100) och *P. chlororaphis* (Pc100), halverade doser av *C. rosea* (Cr50) och *P. chlororaphis* (Pc50), full dos av en blandning av organismerna (Mix100), halverad dos av blandningen (Mix50) samt en vattenbehandlad kontroll (K; medelvärde för respektive behandling, $n=3$). Ingen signifikans fanns mellan behandlingarna (Tukeys test $P<0,05$). Konidierna tvättades av halmen vid försökets avslut, sju veckor efter start.

6 Diskussion

C. rosea tycks vara en effektiv hämmare av perithecieproduktionen hos *F. graminearum*. Även den lägre dosen minskade produktionen i försök 2. Det vore intressant att undersöka vilken den optimala sporkoncentrationen är för att få till en så effektiv bekämpning som möjligt. Än så länge finns inga större försök gjorda som styrker att *C. rosea* har en peritheciehämmande verkan. Den minskade konidieproduktionen (Luongo m fl., 2005) uteblev dock. I det första försöket var konidieproduktionen signifikant till och med högre än i obehandlat led. Man har visat att *C. rosea* kan hämma konidieproduktionen hos *F. culmorum* (Jensen m fl., 2000; Hue m fl., 2009) som liksom *F. graminearum* orsakar axfusarios. Den bildar dock inga perithecier så det går inte att jämföra resultat på den punkten.

I dessa försök har effekten av *P. chlororaphis* uteblivit. Den har i tidigare försök kunnat motverka fusariumangrepp på groddplantor (M. Hökeberg, muntl). Anledningen till dess låga effekt kan bero på att den har haft svårt att konkurrera mot *F. graminearum* under de förhållanden som rått under försöket. *P. chlororaphis* används främst i biologiska betningsmedel. Det är möjligt att dess goda effekt där beror på att de har tid att kolonisera utsädet innan det utsätts för miljöer som är gynnsamma för utsädesburna skadegörare. I detta försök tillsattes först *F. graminearum* i en relativt hög koncentration och *P. chlororaphis* applicerades först en stund efteråt. Det fermentat som användes i försöket innehöll sannolikt mycket näring från det odlingsmedium som använts till uppförökning av *P. chlororaphis*. Detta kan ha gynnat *F. graminearum*. Om näring tillfördes vid behandlingen med *C. rosea* var den i så fall mycket liten i jämförelse eftersom konidierna sköljdes av odlingsmediet utan att det blandades ut i sporsuspensionen. Halm är relativt näringsfattigt och ett eventuellt tillskott av mer lättillgängliga näringsämnen kan ligga bakom att ingen effekt av *P. chlororaphis* kunde påvisas. Det skedde en kontamination med *C. rosea* i det autoklaverade ledet i försök 1 och den upptäcktes först vid försöket avslut. Det är oklart huruvida detta påverkade

utgången av försöket. Resultaten som redovisas i figurerna 4, 6 och 8 bör därför inte betraktas som säkra. Den troliga orsaken till kontamineringen är att de verktyg som användes vid bla. perithecieräkningen (pincett och nålar) inte var tillräckligt rengjorda och att konidier från *C. rosea* fanns kvar på dem.

Resultaten gällande mängden konidier i de båda försöken var inte samstämmiga vilket gör det svårt att dra slutsatser kring det. I figur 8 och 9 redovisas konidiekoncentrationen uppdelat på halmbehandling i försök 1. Där finns en signifikant skillnad i koncentration i det autoklaverade ledet mellan de båda behandlingarna och kontrollen som inte finns på den ytsteriliserade halmen och inte heller i försök 2 (figur 13). Det är möjligt att denna signifikans beror på att *C. rosea* var närvarande i alla petriskålarna och därför stressade *F. graminearum* till att producera mer konidier. Å andra sidan kan man betrakta de led behandlade med *P. chlororaphis* som sedan kontaminerades med *C. rosea* som en motsvarighet till den mix som användes i försök 2 och där fanns ingen statistisk signifikans. Det skulle kunna vara så att *F. graminearum* när den blir utsatt för ökad konkurrens bildar mer konidier medan perithecieproduktionen gynnas av låg konkurrens.

Trots upprepade försök har inga ascosporer samlats in under försökens gång. Det kan ha ett antal förklaringar. Den första faktorn som spelar in i frigörandet av ascosporer är den relativa luftfuktigheten. I litteraturen finns något motstridiga uppgifter om sambandet mellan fuktighet och sporspridning. Trail (2002) anser att ökad relativ luftfuktighet leder till ökad mängd frisläppta ascosporer medan Paulitz (1996) hävdar att en relativ luftfuktighet över 80 % hämmar utskjutandet. Vidare menar han att den största aktiviteten sker under sen kväll och natt. Luftfuktigheten har hållits på en relativt hög nivå men det har också hänt att skålarna varit ganska uttorkade, detta borde ha givit åtminstone stundvis gynnande förutsättningar för utskjutande av ascosporer. Tschanz (1976) visade att temperaturer mellan 16 och 26 °C medför att ascosporer frigörs. Temperaturen i värmeskåpet har varit 20 °C förutom de två sista veckorna av försök två då temperaturen under de mörka timmarna sänktes till 15 °C. Således borde även temperaturförhållandena varit gynnsamma. Möjligen är det en kombination av temperatur och relativ luftfuktighet som är orsaken till att inga data kunde samlas in. Om försöket skulle upprepas bör man lägga en större vikt vid att upprätthålla en jämn och hög relativ luftfuktighet, den bör dock inte överstiga 80 %.

De konidiekoncentrationer (doser) som använts i försöket har inte haft någon direkt vetenskaplig grund eftersom just *C. rosea* aldrig tidigare testats i just detta sammanhang. Jag har istället utgått från konidiekoncentrationer från tidigare försök med andra organismer. Det som jag i denna studie kallat för full dos

behöver inte nödvändigtvis vara den maximala dos som eventuellt skulle kunna användas i fält i framtiden. Det är möjligt att en högre dos skulle reducera *F. graminearum* ännu mer. Samtidigt visade försök 2 att även en halverad dos gav bra effekt. En fortsättning på studien skulle vara att undersöka inom vilket koncentrationsintervall *C. rosea* har effekt mot *F. graminearum*.

Om försöket görs om bör man även överväga byta metod för applicering av patogen och biologisk kontrollorganism. I denna studie lades alla halmbitar i en petriskål och tillfördes en mängd konidiesuspension av *F. graminearum* som motsvarade 200 µl/halmbit. Det finns en risk att alla halmbitar inte fått samma mängd konidier på sig vilket kan förklara variationer i perithecieantal och konidiekoncentrationen vid försökets slut. De biologiska kontrollorganismerna kan ha blivit ojämnt fördelade då 200 µl av dem applicerades på varje halmbit med pipett. En alternativ metod till appliceringen av organismerna kunde vara att spraya på dem, det skulle ge en jämnare spridning och tillförd konidie- och bakteriemängd skulle troligen variera mindre mellan halmbitarna.

Det är också viktigt att ta reda på inom vilket koncentrationsintervall *F. graminearum* kan förekomma i fält samt hur de biologiska kontrollorganismernas effekt påverkas av hur hög patogenens koncentration är. I ett utökat försök bör biokontrolleffekt vid olika koncentrationer av både patogen och kontrollorganism undersökas samt olika proportioner mellan kontrollorganismerna.

En andra fortsättning på denna studie är att undersöka hur perithecieproduktionen påverkas på labb i andra temperaturer. I och med att detta försök är gjort på halm är det rimligt att anta att målet med att utvärdera *C. rosea* som biologisk kontrollorganism är att i framtiden kunna använda den för en stubbehandling på hösten. Det skulle vara ett verktyg för att i reducerade jordbearbetningssystem ändå kunna reducera inokulummängden till nästkommande odlingssäsong. På hösten, när förstadierna till perithecierna bildas, är medeltemperaturen betydligt lägre än de 15-20 °C som varit i detta försök och det kommer att innebära helt andra förutsättningar för etablering för båda arterna.

Ytterligare ett förbättringsförslag är att studera hur groningsförmågan hos konidierna påverkas efter behandling med de biologiska kontrollorganismerna. Även påverkan på ascosporens groningsförmåga bör undersökas. Detta kan man enkelt göra genom att låta insamlade konidier och ascosporer tillväxa på ett odlingsmedium och se hur stor andel som gror. Man bör också ta reda på om det är konidier eller ascosporer som är viktigast för *F. graminearum*s spridning och inokulering. Utan den kunskapen är det svårt att dra slutsatser kring möjligheten att använda *C. rosea* och *P. chlororaphis* i en framtida bekämpningssituation. I

denna studie sågs ingen effekt på mängden konidier som producerades men deras grobarhet är okänd. Den skulle kunna vara kraftigt reducerad tack vara de biologiska kontrollorganismerna.

I detta försök gjordes tre upprepningar av varje behandling och fyra halmbitar användes i varje upprepning. Totalt insamlades alltså data från tolv halmbitar per upprepning. Medelvärden av upprepningarna behandlades sedan i dataanalysen. Eftersom det endast gjordes tre upprepningar påverkar variationer i perithecieantal och konidiekoncentration mycket. Hade fler replikat gjorts hade denna variation dämpats.

I slutändan måste fältförsök göras för att fastställa huruvida biologisk bekämpning med *C. rosea* eller *P. chlororaphis* har någon effekt eller inte. I fält råder förutsättningar som inte går att återskapa på labb och i slutändan är det i fält man vill kunna ha möjlighet till biologisk bekämpning, särskilt om man som tidigare nämnts tillämpar reducerad jordbearbetning. Förutom att de biologiska kontrollorganismerna kommer att utsättas för mer skiftande miljö än i laborieförsök kommer även konkurrenssituationen att vara annorlunda. I detta försök användes autoklaverad och ytsteriliserad halm för att få en första uppfattning om organismernas potential. Icke-behandlad halm har naturligtvis en mikroflora och mikrofauna som kan komma att påverka både *F. graminearum* men också de biologiska kontrollorganismernas etableringsförmåga. Ett fusariumangrepps styrka och den biologiska bekämpningens effektivitet kommer att bero på hur väl patogen och kontrollorganism kan konkurrera sinsemellan och mot andra organismer.

7 Litteraturlista

- Bakker, P.A.H.M., Pieterse C.M.J., and van Loon, L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97(2), pp. 230-243.
- Bernhoft, A., Clasen, P.-E., Kristoffersen, A.B. and Torp, M. 2010. Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 27(6), pp. 842–852.
- Dill-Macky, R. 2008. Cultural control practices for fusarium head blight: Problems and solutions. *CEREAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 36.
- Dill-Macky, R. and Jones, R.K. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *PLANT DISEASE* 84(1).
- Gilbert, J. and Fernando, W. g d 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. *Canadian journal of plant pathology = Revue Canadienne de phytopathologie* 26(4), pp. 464–472.
- Henriksen, B. and Elen, O. 2005. Natural *Fusarium* grain infection level in wheat, barley and oat after early application of fungicides and herbicides. *Journal of Phytopathology* 153(4), pp. 214–220.
- Hue, A. g, Voldeng, H. d, Savard, M. e, Fedak, G., Tian, X. and Hsiang, T. 2009. Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31(2).
- Inch, S. and Gilbert, J. 2007. Effect of *Trichoderma harzianum* on perithecial production of *Gibberella zeae* on wheat straw. *Biocontrol science and technology* 17(5), pp. 635–646.
- Jensen, B., Knudsen, I.M.B. and Jensen, D.F. 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 106(3), pp. 233–242.
- Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meekes, E., Haas, L.D., Plas, C. l V.D. and Kohl, J. 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol science and technology* 15(3), pp. 229–242.
- Pachenari, A. and Dix, N.J. 1980. Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. *Transactions of the British Mycological Society* 74(3), pp. 561–566.
- Palazzini, J.M., Groenenboom-de Haas, B.H., Torres, A.M., Köhl, J. and Chulze, S.N. 2013. Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. on wheat stubble in Argentina. *Plant Pathology* 62(4), pp. 859–866.

- Park, J. y., Oh, S. a., Anderson, A. j., Neiswender, J., Kim, J.-C. and Kim, Y. c. 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Letters in Applied Microbiology* 52(5), pp. 532–537.
- Paulitz, T.C. 1996. Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant Disease* 80(6), p. 674.
- SJV 2013. Nationella branschriktlinjer för att undvika Fusariumtoxiner i spannmål 2013. . Available at:
<http://www.jordbruksverket.se/download/18.16b04c01371197347d8000901/1369290347231/Nationella+Branschriktlinjer+Fusarium.pdf>.
- Steinkellner, S. and Langer, I. 2004. Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant and Soil* 267(1-2), pp. 13–22.
- Trail, F. and Common, R. 2000. Perithecial development by *Gibberella zeae*: A light microscopy study. *Mycologia* 92(1), pp. 130–138.
- Trail, F., Xu, H., Loranger, R. and Gadoury, D. 2002. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* 94(2), pp. 181–189.
- Tschanz, A.T., Horst, R.K. and Nelson, P.E. 1976. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 68(2), pp. 327–340.
- Vakili, N.G. 1985. Mycoparasitic fungi associated with potential stalk rot pathogens of corn. *Phytopathology* 75(11), p. 1201.
- Beslut gällande godkännande av bekämpningsmedel: Kemikalieinspektionens
 bekämpningsmedelsregister. <http://webapps.kemi.se/BkmRegistret/Kemi.Spider.Web.External/>

8 Bilagor

8.1 Bilaga 1 – recept SNA

1 g	KH_2PO_4
1 g	KNO_3
0,5 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,5 g	KCl
0,5 g	Glukos
0,2 g	Sackaros
15 g	Agar
1000 ml	H_2O

Blandningen autoklaverades sedan i 20 minuter i 120 grader innan den fördelades i petriskålarna.